

微生物を用いる変異原性試験の具体的手法及び試験結果の評価方法

I 試験の手法

以下では、プレインキュベーション法、プレート法及びガスばく露法による試験の手法を示す。

1 試験の準備

(1) 試験に使用する器具、試薬等の滅菌

微生物を用いる変異原性試験(以下「試験」という。)に使用する器具、試薬等で、あらかじめ滅菌されたもの以外のもので雑菌の混入するおそれのあるものについては、滅菌しなければならない。

(2) テスト菌株の特性検査

凍結保存するテスト菌株は、次の特性等について検査し、それぞれの菌株に特有の性質を持っていることを確認する。

イ アミノ酸要求性

ロ 紫外線感受性

ハ 膜変異rfa特性

ニ プラスミド由来の薬剤耐性

ホ 陰性対照値

ヘ 陽性対照値

(3) テスト菌株の保存

テスト菌株の保存には特性を確認した後、単一コロニーより増殖させた菌懸濁液を少量ずつ凍結保存する(これを「菌凍結液」とする。)

(4) 培養条件の決定

テスト菌株の適切な培養条件は、経時的に生菌数を求める方法で得られた生育曲線より決定する。

(5) テスト菌株の前培養

イ (3)の菌凍結液を解凍し、ニュートリエントブロス培養液に一定量を接種する。なお、菌凍結液を解凍したものの残りは再使用してはならない。

ロ 37℃で培養し、(4)で求めた培養条件に基づき静止期の初期で培養を止め、それ以上増殖しないようにする。

ハ 前培養液について、生菌数が 1×10^9 /ml以上であることを確認する。

ニ テスト菌株の前培養液は、試験ごとに新しく培養したものを用いなければならない。

(6) 被験物質溶液等の調製

イ プレインキュベーション法及びプレート法の場合

試験を行う化学物質(以下「被験物質」という。)の溶液等は被験物質の性状により次の溶液等とする。

(イ) 水又はDMSOに安定な被験物質

- ① 水に可溶である場合…水溶液
- ② 水に難溶でDMSOに可溶である場合…DMSO溶液
- ③ 水及びDMSOに難溶である場合…水又はDMSO懸濁液

(ロ) 水及びDMSOに懸濁できない場合又は水及びDMSOに不安定な被験物質

被験物質の溶解性及び安定性並びにテスト菌株及びS9 mixに対する毒性を考慮して選んだ適切な有機溶媒に溶解又は懸濁したものをを用いる。

(ハ) 水に不安定な被験物質は、適切な方法で脱水した有機溶媒に溶解又は懸濁する。

ロ ガスばく露法の場合

被験物質ガスの調製は、被験物質の性状により次のように行う。

(イ) 被験物質が気体又は揮発性で、空気中で安定である場合…空気を用いて被験物質を希釈し、又は空気中で気化して調製

(ロ) 被験物質が気体又は揮発性で、空気中の酸素と反応し不安定な場合…窒素、ヘリウム等の不活性な気体を用いて被験物質を希釈し、又はこれらの不活性な気体中で気化して調製

2 試験の実施

(1) 試験に用いるテスト菌株

試験に用いるテスト菌株は以下の菌株とする。

- イ ネズミチフス菌 TA98
- ロ ネズミチフス菌 TA100
- ハ ネズミチフス菌 TA1535
- ニ ネズミチフス菌 TA1537、TA97又はTA97a
- ホ 大腸菌WP2uvrA、大腸菌WP2uvrA/pKM101又はネズミチフス菌TA102

被験物質の性質からみてこれらの菌株以外の菌株を用いて試験を行う必要があると認められる場合には、当該菌株を追加しなければならない。

(2) 試験方法の選択

試験はプレインキュベーション法、プレート法又はガスばく露法で実施する。なお、揮発性液体及びガス状物質についてはガスばく露法で実施すること。

プレインキュベーション法、プレート法又はガスばく露法は、代謝活性化系を用いる場合及び用いない場合の両条件下で試験を実施する。

代謝活性化系を用いる場合のS9 mixは以下の組成とする。

S9 mix 1 ml中の組成

S9分画	10～30%(0.1～0.3 ml)
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
グルコース 6-リン酸	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)	100 μmol

代謝活性化系を用いない場合はS9 mixの代わりに0.1 Mのナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)を用いる。

(3) プレート数

すべての試験(用量設定試験、本試験及び確認試験)は2枚以上のプレートを用いて行う。

(4) 用量設定試験

この試験は、被験物質の沈殿の有無と各テスト菌株に対する生育阻害を調べ、本試験を行う場合の被験物質の用量範囲を決定するための試験である。

本試験と同じ手法を用い、代謝活性化系を用いる場合と用いない場合の両条件下で最高用量5mg/プレート(ガスばく露法の場合には、50%(体積%)又は調製可能な最大濃度)から適切な公比で5段階以上の用量について実施する。

(5) 本試験の用量設定

本試験の用量は、用量設定試験の結果より求める。

イ 用量設定試験において、変異原性が認められた場合

用量依存性が得られるように適切な間隔で用量を設定する。

ロ 用量設定試験において、変異原性が認められなかった場合

(イ) 用量設定試験において、被験物質がテスト菌株に対して生育阻害を示さず、かつ、被験物質の沈殿が認められない場合は、最高用量5 mg/プレート(ガスばく露法の場合には、50%(体積%)又は調製可能な最大濃度)とし、適切な間隔で用量を設定する。

(ロ) 用量設定試験において、被験物質がテスト菌株に対して生育阻害を示した場合は、沈殿の有無にかかわらず最高用量は被験物質がテスト菌株に対して生育阻害を示す用量とし、適切な間隔で用量を設定する

(ハ) 用量設定試験において、被験物質がすべてのテスト菌株に対して生育阻害を示さず、かつ、被験物質の沈殿が認められた場合は、沈殿の認められる用量段階を1段階以上含めた適切な間隔で用量を設定する。

(注：用量設定試験において、菌株Aでは生育阻害及び被験物質の沈殿が認められ、菌株Bでは被験物質の沈殿のみが認められた場合には、菌株Bについて沈殿が認められる用量を基準として用量設定を行うことはできず、5 mg/プレート（ガスばく露法の場合には、50%（体積%）又は調製可能な最大濃度）を最高用量として試験を行わなければならない。）

(6) 本試験

試験は、代謝活性化系を用いる場合及び用いない場合の両条件下で(5)で設定した用量で5段階以上の試験を実施する。

なお、用量設定試験と本試験は同一の培養菌液を用いて行ってはならない。

(7) 確認試験

用量設定試験と本試験の結果が一致しない場合には再現性を確認するために確認試験を実施する。

また、プレート法による用量設定試験又は本試験において陰性の結果が得られた場合には、プレインキュベーション法による本試験又は確認試験を実施することが望ましいこと。

(8) 対照

上記のすべての試験において、必ず陰性対照と陽性対照を含める。

イ 陰性対照

各テスト菌株について被験物質の調製に用いた溶媒（ガスばく露法の場合には、被験物質の調製に用いた気体）を用いる。

ロ 陽性対照

S9 mixを必要とする陽性対照物質とS9 mixを必要としない陽性対照物質を、適切な用量で用いる。

(9) 無菌テスト

上記のすべての試験において、最高用量の被験物質溶液（ガスばく露法の場合には、被験物質ガス）、S9 mixについて試験に用いた容量で無菌テストを実施する。

3 試験の方法

(1) プレインキュベーション法

イ 代謝活性化系を用いない場合

- (イ) 滅菌された試験管に被験物質溶液を入れる。
- (ロ) (イ)に0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)を0.5 ml添加し、続いてテスト菌株前培養液を0.1 ml加えてよく混合する。
- (ハ) (ロ)を37°Cで振盪しながら一定時間プレインキュベートする。
- (ニ) (ハ)にトッパアガーを2 ml加えてよく混合する。
- (ホ) (ニ)を最少グルコース寒天平板培地(プレート)の上に注ぎ一様に広げる。
- (ヘ) 37°Cで48時間以上インキュベートする。
- (ト) すべてのプレートについて、テスト菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて調べる。また、被験物質の沈殿の有無を肉眼で調べる。
- (チ) 復帰突然変異により生じたコロニー数を数える。

ロ 代謝活性化系を用いる場合

- (イ) 滅菌された試験管に被験物質溶液を入れる。
- (ロ) (イ)にS9 mixを0.5 ml添加し、続いてテスト菌株前培養液を0.1 ml加えてよく混合する。
- (ハ) イの(ハ)～(チ)と同じ操作を実施する。

(2) プレート法

イ 代謝活性化系を用いない場合

- (イ) 滅菌された試験管に被験物質溶液を入れる。
- (ロ) (イ)に0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)を0.5 ml添加し、続いてテスト菌株前培養液を0.1 ml加える。
- (ハ) (ロ)にトッパアガーを2 ml加えてよく混合する。
- (ニ) (ハ)をプレートの上に注ぎ一様に広げる。
- (ホ) 37°Cで48時間以上インキュベートする。
- (ヘ) すべてのプレートについて、テスト菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて調べる。また、被験物質の沈殿の有無を肉眼で調べる。
- (ト) 復帰突然変異により生じたコロニー数を数える。

ロ 代謝活性化系を用いる場合

- (イ) 滅菌された試験管に被験物質溶液を入れる。
- (ロ) (イ)にS9 mixを0.5 ml添加し、続いてテスト菌株前培養液を0.1 ml加える。
- (ハ) イの(ハ)～(ト)と同じ操作を実施する。

(3) ガスばく露法

イ 代謝活性化系を用いない場合

- (イ) 滅菌された試験管に0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)を0.5 ml入

れ、続いてテスト菌株前培養液を0.1 ml加えてよく混合する。

(ロ) (イ)にトッパアガーを2ml加えてよく混合する。

(ハ) (ロ)を最少グルコース寒天平板培地(プレート)の上に注ぎ一様に広げる。

(ニ) プレートのふたを外し、上下転倒させてプレートホルダーに固定し、適当な容器に用量別に入れる。

(ホ) 用いた容器を密封した後、プレート当たり500 mlの濃度調整した被験物質ガスを充填し、ばく露する。

(ヘ) プレートを入れた容器を恒温培養器に入れ、37℃で24時間(窒素、ヘリウム等を希釈気体として使用した場合には、2~12時間程度)ばく露する。

(ト) ばく露後、ばく露気体を空気で置換した後、プレートホルダーを取り出し、ふたをした後、各用量別にビニル袋に上下を転倒して収容し、37℃で24時間以上培養する。

(チ) すべてのプレートについて、テスト菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて調べる。

(リ) 復帰突然変異により生じたコロニー数を数える。

ロ 代謝活性化系を用いる場合

(イ)滅菌された試験管にS9 mixを0.5 ml添加し、続いてテスト菌株前培養液を0.1 ml加えてよく混合する。

(ロ) イの(ロ)~(リ)と同じ操作を実施する。

4 結果の表示

復帰変異コロニー数は、各々のプレートの実測値とその平均値を表示し、用量一反応曲線の図を添付する。

5 報告書

(1) 最終報告書

最終報告書に記載すべき内容は、GLP基準(昭和63年労働省告示第76号)に記載された内容に以下の内容を加えて作成する。

イ 被験物質

保管方法、CAS番号(既知の場合)

ロ 被験物質溶液の調製方法及び溶媒の名称とその選択理由(ガスばく露法の場合には、被験物質ガスの調製方法及び希釈用ガスの名称とその選択理由)

ハ 陽性対照物質

陽性対照物質溶液の調製方法、溶液の保管及び方法

ニ S9及びS9 mix

S9の入手方法等、S9の調製方法、S9 mixの組成

ホ 試験系

試験に用いたテスト菌株の名称、選択理由、入手方法及び保存方法

ヘ 前培養の条件及び培地

前培養条件、ニュートリエントブロス、前培養終了時の生菌数、最少グルコース寒天平板培地、トッペアガー

ト 試験方法等

採用した試験方法、使用プレート数、試験の操作手順、用量の設定理由、コロニーカウント方法、生育阻害の有無の確認方法、無菌テスト、沈殿の有無の確認方法、結果の判定基準

チ 試験結果及び考察

無菌テストの結果、生育阻害の有無、被験物質の沈殿の有無、陰性対照値と陽性対照値の背景データ

リ その他必要とされる事項

参考文献

(2) 労働安全衛生法第57条の2第1項の規定に基づく新規化学物質の届出に用いる試験結果報告書

新規化学物質の製造又は輸入に係る届出に用いる試験結果報告書は、平成9年9月29日付け基発第653号「微生物を用いる変異原性試験結果報告書様式の改正について」の別添様式によること。ただし、ガスばく露法の場合には、一部の項目を修正して使用すること。

6 その他

- (1) 試験に使用した化学物質等の取扱い及び廃棄に当たっては、法令の定めのあるものは、当該法令の定めによることはもとより、法令の定めのないものであってもその取扱い及び廃棄には十分注意しなければならない。
- (2) ガスばく露法による試験において、被験物質を取り扱う操作は、労働者が被験物質にばく露しないよう、ケミカルハザード用安全キャビネット等適切な設備を用いて行うこと。
- (3) 被験物質の安全性を確認する上で、試験責任者がここに示した手法等から変更を必要とする場合は、試験責任者の判断によることとし、最終報告書及び届出に用いる試験結果報告書にその旨を記載すること。

II 結果の評価

1 評価の前提条件

ある物質について行われた変異原性試験は、それが適正な菌、代謝活性化系及び試薬等を用い、上記 I の手法に従って適切に実施された場合に初めて、当該試験結果が評価の対象となる。

2 結果の判定基準

化学物質の用量の増加とともに復帰変異コロニー数が明らかに増加し（原則として、陰性対照の 2 倍以上）、かつ、再現性が得られる場合に陽性と判定する。

3 評価指標

(1) プレインキュベーション法及びプレート法の場合

化学物質の変異原性の強さについては、化学物質の変異原性比活性を用いて相対的比較を行う。比活性は陽性と判定した用量の数値を次式に当てはめて計算し、被験物質の用量(単位mg/プレート)当たりの最高値を求める。

$$\text{比活性} = \frac{\{\text{当該用量におけるプレート当たりの復帰変異コロニー数}\} - \{\text{陰性対象の復帰変異コロニー数}\}}{\text{当該用量 (mg/プレート)}}$$

(2) ガスばく露法の場合

化学物質の変異原性の強さについては、陽性を示す最小用量（体積%）により相対的比較を行う。